

DISTINÇÃO DE FENÓMENOS DE *BULKING* EM LAMAS ACTIVADAS POR TÉCNICAS DE ANÁLISE DE IMAGEM

04

António L. AMARAL Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, Rua Pedro Nunes, Quinta da Nora, 3030-199 Coimbra, Portugal, lpamaral@isec.pt, Tel: (+351) 239 790 200; IBB – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Univ. do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal
IBB – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Eng. Biológica, Univ. do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, Tel: (+351) 253 604 400

Daniela P. MESQUITA IBB – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Eng. Biológica, Univ. do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, daniela@deb.uminho.pt
Tel: (+351) 253 604 400

Eugénio C. FERREIRA IBB – Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Eng. Biológica, Univ. do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, ecferreira@deb.uminho.pt, Tel: (+351) 253 604 407



RESUMO

No corrente trabalho pretendeu-se detectar e identificar diferentes tipos de perturbações em lamas activadas (*bulking* filamentoso, *bulking* viscoso e crescimento de flocos *pin point*) por técnicas de processamento e análise de imagem. Para o efeito foram determinados os parâmetros operacionais sólidos suspensos totais (SST) e índice volumétrico de lamas (IVL), assim como diversos parâmetros morfológicos (conteúdo e morfologia da biomassa agregada e filamentosa), obtidos por análise de imagem. Os resultados obtidos permitiram o esclarecimento das diferentes inter-relações presentes entre cada uma das condições estudadas e os parâmetros que caracterizaram a biomassa microbiana, assim como a aferição do parâmetro operacional IVL, a partir da caracterização da biomassa.

Palavras-chave: análise de imagem; *bulking*; lamas activadas

■ 1. INTRODUÇÃO

O sistema de lamas activadas é o processo biológico mais usado no tratamento de águas residuais. Este sistema consiste num tanque de arejamento onde ocorre a fase bioquímica e num sedimentador onde ocorre a fase física. A fase física de separação sólida-líquida é uma das operações mais críticas em processos de lamas activadas. Esta fase apresenta três funções: espessamento (recirculação das lamas para o tanque de arejamento); clarificação do efluente; e armazenamento de lamas. A sedimentabilidade das lamas é usualmente dependente da estrutura, densidade e tamanho dos agregados microbianos, podendo estas propriedades sofrer súbitas alterações devido a variações ou perturbações das condições numa ETAR (Wilén *et al.*, 1999). É ainda necessário um equilíbrio entre bactérias filamentosas e bactérias formadoras de flocos para manter uma boa sedimentabilidade das lamas (Jenkins *et al.*, 2003). De acordo com Bitton (1994) as perturbações nos sistemas de lamas activadas podem ser de diferentes tipos: flocos *pin point* (pequenas dimensões) pela ausência de bactérias filamentosas, apresentando baixa sedimentabilidade e elevado conteúdo orgânico no efluente final; *bulking* filamentoso pela proliferação de bactérias filamentosas ligando os flocos provocando baixa sedimentabilidade; crescimento disperso pela ausência de bactérias formadoras de flocos, apresentando elevada turbidez e conteúdo orgânico no efluente final; e *bulking* viscoso pela presença de grandes flocos com baixa capacidade de sedimentação e compactação.

A observação microscópica torna-se assim um método de extrema importância para moni-

zar e controlar os sistemas de lamas activadas e, como reflexo, técnicas microscópicas têm vindo a ser utilizadas para caracterizar os agregados microbianos de lamas activadas (Andreadakis, 1993; Barbusinski e Koscielniak, 1995). A associação de técnicas de processamento e análise de imagem à visualização microscópica tem ainda permitido uma avaliação mais expedita das propriedades das lamas activadas (Li e Ganczarczyk, 1991; Grijspeerdit e Verstraete, 1997). Actualmente, vários autores têm desenvolvido metodologias de análise de imagem para caracterização da biomassa do sistema, destacando-se da Motta *et al.* (2001, 2002), Cenens *et al.* (2002), Amaral (2003), Amaral e Ferreira (2005), Jenné *et al.* (2006) e Arelli *et al.* (2009). Assim, a relação entre as propriedades de sedimentabilidade e as características da biomassa agregada e filamentosa tem vindo a ser estudada, tendo já sido estabelecidas correlações entre o IVL e as propriedades morfológicas das lamas, principalmente em situações de *bulking* filamentoso (da Motta *et al.*, 2002; Amaral e Ferreira, 2005). Este trabalho tem por objectivo a identificação e quantificação de agregados microbianos e de bactérias filamentosas, provenientes de uma instalação laboratorial de lamas activadas, através de uma metodologia de análise de imagem, com intuito de detectar diferentes condições de funcionamento das lamas activadas (operação normal, flocos *pin point*, *bulking* filamentoso e *bulking* viscoso) que podem afectar a sedimentabilidade das lamas, e correlacionar os parâmetros operacionais com os morfológicos.

■ 2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição da instalação laboratorial

Os dados experimentais deste trabalho foram obtidos através de um sistema laboratorial de lamas activadas composto por um tanque de arejamento com 17 L de biomassa em suspensão, seguido por um sedimentador cilíndrico com 2.5 L de capacidade. O tanque de arejamento foi inoculado com lamas activadas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais domésticas localizada em Braga. A alimentação sintética concentrada fornecida ao sistema foi preparada em laboratório de acordo com Kim *et al.* (2008) usando acetato como principal fonte de carbono. A

composição utilizada foi a seguinte (em mg L⁻¹): NaCH₃COO.3H₂O 2073; (NH₄)₂SO₄ 140; MgSO₄.7H₂O 25; KH₂PO₄ 44; K₂HPO₄.2H₂O 59; CaCl₂.2H₂O 30; FeCl₃.6H₂O 18.8; NaHCO₃ 105. Subsequentemente, a alimentação foi diluída para se obter uma CQO (carência química de oxigénio) de 1000 mg mL⁻¹. Uma solução de micronutrientes foi também adicionada à alimentação de forma a permitir a manutenção da biomassa. Durante este estudo, e dependendo das perturbações pretendidas (*bulking* filamentoso, flocos *pin point*, *bulking* viscoso e condições normais), foi alterada a razão alimentação/microrganismos

(A/M). No início de cada experiência foi também necessário re-inocular o sistema para mais rapidamente se atingir as novas condições pretendidas. Durante a operação do sistema, o pH foi controlado por um medidor de pH associado a uma bomba de controlo (Modelo BL 7916-BL 7917, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA). A mistura completa dentro do tanque de arejamento foi garantida pelo fornecimento de

um fluxo contínuo de ar através de um difusor colocado na parte inferior do tanque de arejamento. De forma a manter a concentração de oxigénio a 7 mg O₂ L⁻¹, foi usada uma sonda de oxigénio (TriOmatic 690, WTW, Weilheim, Germany). Finalmente, a recirculação de lamas do sedimentador para o tanque de arejamento foi garantida através de uma bomba de ar.

PUB

SEMPRE A DESCOBRIR NOVOS CAMINHOS

DINAMISMO

CONFIANÇA

EFICIÊNCIA

INOVAÇÃO

QUALIDADE

UTILIDADE
PÚBLICA

UM BEM
VITAL
À VIDA



MOTIVO ESCULTÓRICO
JOSÉ RODRIGUES
1997 ETAR DE PARADA

NUMERO VERDE
800 210 001

Rua Dr. Carlos Felgueiras
Ap. 1010, 4471-909 Maia
229430800 / 229412155

sma-maia@smeas-maia.pt
www.smeas-maia.pt



SMASMAIA
SERVIÇOS MUNICIPALIZADOS
DA CÂMARA MUNICIPAL DA MAIA

2.2 Determinação dos parâmetros operacionais

A obtenção das condições de *bulking* filamentos, formação de flocos *pin point*, *bulking* viscoso e condições normais foi realizada sequencialmente por esta ordem. No início de cada uma das experiências reinoculou-se a biomassa no sistema, para mais rapidamente se atingir as novas condições pretendidas. Foram recolhidas amostras no decurso de cada experiência e determinados parâmetros operacionais tais como os sólidos suspensos totais (SST) e o índice volumétrico de lamas (IVL). Os SST foram determinados usando os procedimentos existentes no Standard Methods (APHA *et al.*, 1989). Este valor foi posteriormente usado para calcular o IVL, determinado por sedimentação da biomassa em suspensão num cone *Imhoff* de 1 L durante 30 minutos (APHA *et al.*, 1989).

2.3 Aquisição e processamento das imagens

A visualização da comunidade microbiana foi efectuada recorrendo a um microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) e a uma câmara Olympus DP25 (Olympus, Tokyo, Japan). As imagens foram visualizadas em campo claro a uma ampliação total de 100 vezes e adquiridas a uma escala de cinzentos de 8 bits e resolução de 1360 x 1024 pixels, por intermédio do *software* de aquisição Cell[^]B (Olympus, Tokyo, Japan). As amostras foram retiradas do tanque de arejamento e a aquisição de imagem foi efectuada em triplicado (usando 3 lâminas) recorrendo a uma micropipeta com uma ponta seccionada para garantir a passagem dos agregados maiores. Em cada triplicado 10 µL de amostra foram colocados numa lâmina e cobertos com uma lamela de 20 mm x 20 mm. Em cada lâmina foram adquiridas 50 imagens (na parte superior, intermédia

e inferior) de modo a obter informação representativa da comunidade microbiana existente no sistema. O programa de processamento e análise de imagem utilizado neste trabalho foi desenvolvido em Matlab 7.3 (The Mathworks, Inc., Natick, USA), e adaptado de uma versão previamente desenvolvida por Amaral (2003). A principal etapa do processamento baseia-se na binarização das imagens referentes aos agregados e bactérias filamentosas através de processos de segmentação e eliminação de detritos (**Figura 1**). A etapa seguinte resume-se à caracterização dos agregados microbianos e das bactérias filamentosas.

2.4 Determinação dos parâmetros morfológicos

A caracterização dos agregados foi efectuada através da divisão em 3 classes tendo por base o diâmetro equivalente (D_{eq}): microflocos ($D_{eq} < 25 \mu m$), mesoflocos ($25 < D_{eq} < 250 \mu m$) e macroflocos ($D_{eq} > 250 \mu m$). Neste estudo, para cada uma das classes determinou-se a área percentual (% Área) de cada classe de agregados. O conteúdo em biomassa agregada (AT/Vol) foi calculado através área total da biomassa agregada e o conteúdo em biomassa filamentosa (CT/Vol) através do comprimento total de filamentos. Finalmente foi determinada, a razão entre o conteúdo de bactérias filamentosas (através do comprimento total de filamentos) e os sólidos suspensos totais, (CT/SST), bem como a razão entre o conteúdo de bactérias filamentosas e de biomassa agregada, através do logaritmo entre o comprimento total de filamentos e a área total de biomassa agregada ($\ln(CT/AT)$).

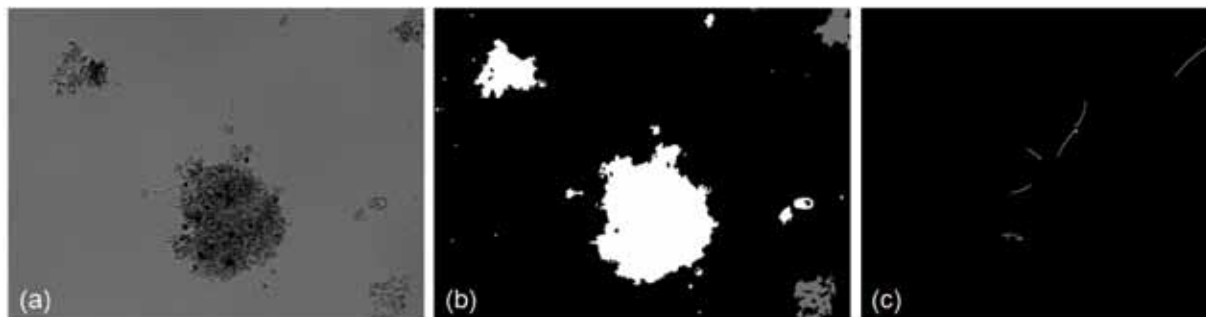


FIGURA 1 | (a) Imagem original, (b) imagem binária dos agregados, (c) imagem binária dos filamentos. A ampliação total das imagens é de 100 vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Índice volumétrico de lamas e sólidos suspensos totais

A obtenção das condições de *bulking* filamentoso, formação de flocos *pin point*, *bulking* viscoso e condições normais foi realizada sequencialmente. Deste modo, o primeiro passo da análise dos resultados obtidos foi o de identificar o período em que, verdadeiramente, estas diferentes condições foram estabelecidas. Para o efeito foram avaliados os valores do IVL para o estabelecimento das condições de *bulking* e dos SST para a obtenção de flocos *pin point* não sedimentáveis.

A evolução do IVL no decurso das várias experiências, representada na **Figura 2**, permitiu determinar a formação de condições de *bulking* nas experiências de *bulking* filamentoso e viscoso, sendo considerado que um valor de IVL superior a 150 mL g⁻¹ corresponde a *bulking*. Enquanto que no decurso das experiências laboratoriais para obtenção de condições normais (CN), *bulking* filamentoso (BF1) e flocos *pin point* (PP), as mesmas foram obtidas logo após o início das mesmas, tal não aconteceu na obtenção de *bulking* viscoso (BV). De facto, após a experiência dos flocos *pin point*, existiu um período transição (TR1) até se obterem as condições de *bulking* viscoso. Durante este período o IVL manteve-se abaixo de 150 mL g⁻¹ e os SST evidenciaram uma descida, o que não se coaduna com *bulking*

viscoso. Para o final desta experiência notou-se uma perturbação no reaktor que resultou inicialmente na obtenção de um segundo período de transição (TR2) e seguidamente na obtenção de novas condições de *bulking* filamentoso (BF2). Durante TR2, verificou-se que, embora o valor de SST se mantivesse inicialmente elevado, os valores do IVL foram inferiores a 150 mL g⁻¹. Após este período observou-se a formação de *bulking* filamentoso (BF2) devido ao facto de, para além de se registar um valor de IVL superior a 150 mL g⁻¹, ter sido notória a presença de elevadas quantidades de bactérias filamentosas (identificadas como *Thiothrix* e Tipo 021N por coloração FISH). O cruzamento destes dados com os obtidos por análise de imagem também confirmou este facto. Verificou-se ainda que o *bulking* filamentoso permitiram atingir maiores valores de IVL, até perto de 500 mL g⁻¹, do que o *bulking* viscoso (até aproximadamente 300 mL g⁻¹). Em relação às restantes condições, verificou-se que os valores de IVL se mantiveram abaixo de 150 mL g⁻¹. Relembre-se que os flocos *pin point*, por praticamente não serem sedimentáveis, não influenciam negativamente o IVL, determinado a partir da parte sedimentável da biomassa.

A descida gradual dos SST, na experiência de formação dos flocos *pin point*, encontra-se de acordo com o previsível fenómeno de *washout* da biomassa agregada, pela formação de agre-

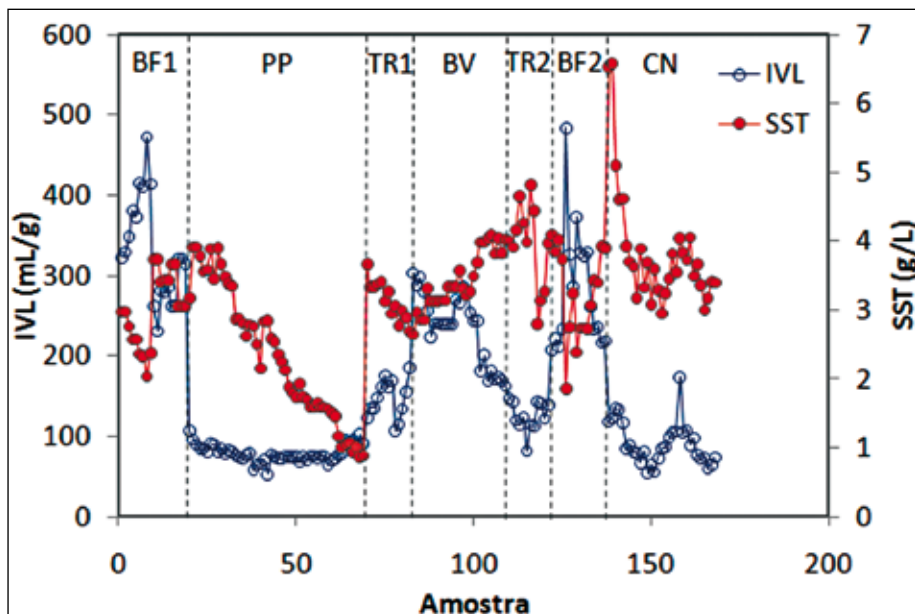


FIGURA 2 | Evolução experimental do IVL e dos SST. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – Flocos *pin point*; TR – Período de transição; BV – *Bulking* viscoso; CN – condições normais)

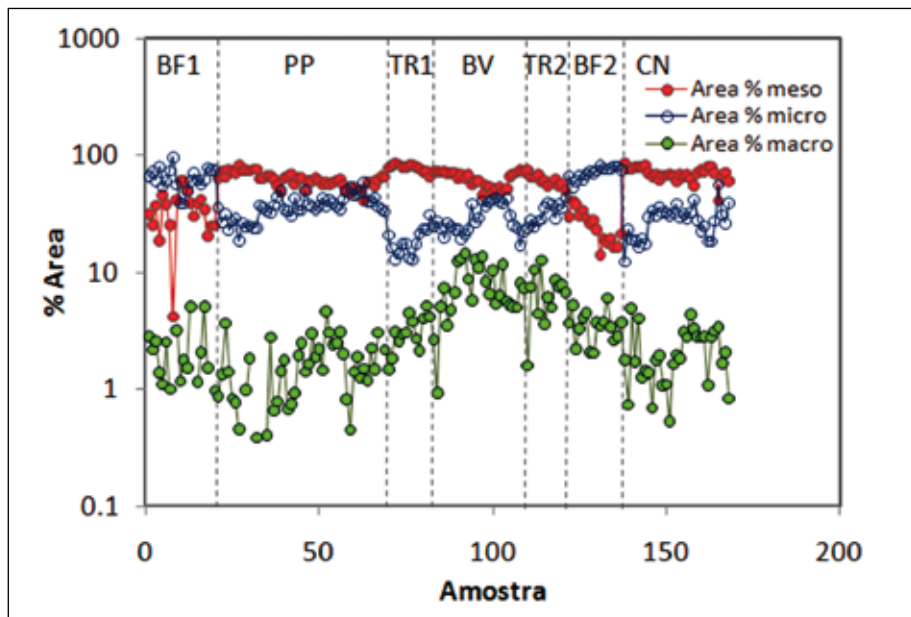


FIGURA 3 | Evolução experimental da percentagem de área de microflocos, mesoflocos e macroflocos. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – Flocos *pin point*; TR – Período de transição; BV – *Bulking* viscoso; CN – condições normais)

gados não sedimentáveis e mecanicamente frágeis. O oposto pôde ser observado na experiência de obtenção de condições de *bulking* viscoso, com um aumento dos SST, concordante com o expectável aumento da biomassa agregada. De referir ainda que, embora a biomassa agregada possua uma sedimentabilidade inferior aos flocos obtidos em condições normais, implicando um aumento do tempo necessário para a sua sedimentabilidade e um aumento do IVL, estes eventualmente sedimentam, ao contrário dos flocos *pin point*, o que faz com que este tipo de biomassa não esteja sujeito às mesmas condições de *washout* que os flocos *pin point*. Em relação às experiências de obtenção de condições de *bulking* filamentoso e de flocos normais, observou-se uma oscilação dos SST, sendo que no início da experiência de condições normais se verificou uma clara diminuição dos SST em virtude de se ter partido de uma elevada concentração de biomassa presente no inóculo introduzido no início desta experiência.

3.2 Parâmetros morfológicos da biomassa

Através da utilização de técnicas de análise de imagem foi possível determinar a estrutura da biomassa no tocante à sua composição em biomassa agregada e filamentosa. A percentagem de biomassa agregada em micro, meso e macroflocos encontra-se representada na **Figura 3**. Os períodos de *bulking* filamentoso

(BF1 e BF2) destacaram-se dos restantes por apresentarem uma percentagem de microflocos superior à de mesoflocos. Este facto reflecte uma estrutura da biomassa agregada com um elevado conteúdo em microflocos, quer sob a forma de agregados dispersos no licor misto, quer ligados a bactérias filamentosas. Por oposição, os microflocos que compõem os flocos *pin point* não se encontraram significativamente ligados a biomassa filamentosa, mas dispersos no licor misto. Ainda durante a experiência de obtenção de flocos *pin point* verificou-se que a percentagem de microflocos não foi tão elevada quanto seria expectável, encontrando-se, inclusivamente, abaixo da percentagem de mesoflocos. Este facto indicou que, durante a experiência de obtenção de flocos *pin point*, não foram obtidos microflocos em tão elevada quantidade quanto o desejável, apesar de estes agregados se terem revelado praticamente não sedimentáveis e facilmente removíveis do reactor, como demonstra o *washout* sofrido pela biomassa. A análise da estrutura da biomassa formada em *bulking* viscoso permitiu evidenciar uma maior composição em macroflocos, que as restantes condições. Tal facto seria expectável pela formação de agregados de maiores dimensões devido, essencialmente, à sobreprodução de exopolímeros. A estrutura da biomassa no período de condições normais, revelou um predomínio de mesoflocos em relação aos mi-

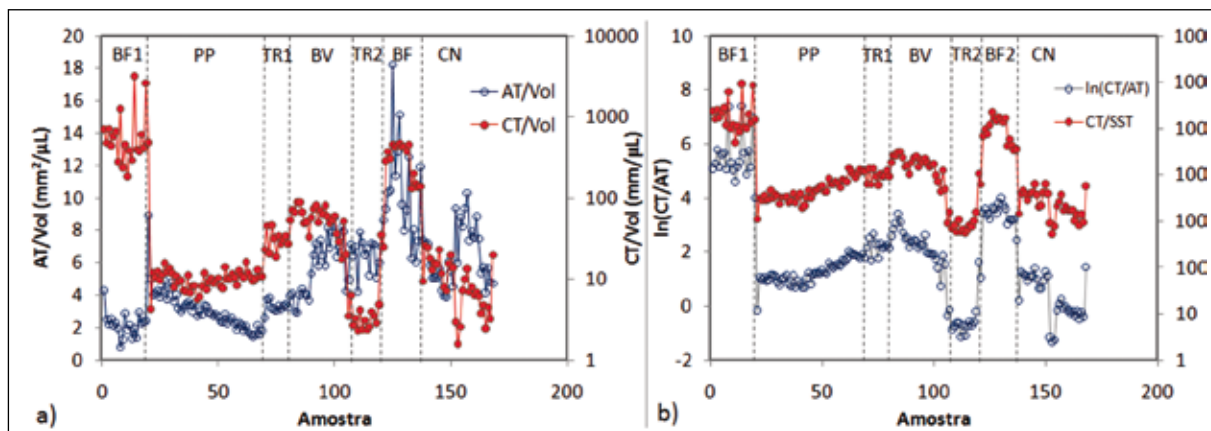


FIGURA 4 | Evolução experimental do (a) conteúdo em biomassa agregada (AT/Vol) e filamentosa (CT/Vol) e (b) do CT/SST e do $\ln(CT/AT)$. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – *Flocos pin point*; TR – Período de transição; BV – *Bulking* viscoso; CN – condições normais)

croflocos e valores residuais de macroflocos.

O conteúdo da biomassa em biomassa agregada (AT/Vol) e filamentosa (CT/Vol), a razão entre ambos ($\ln(CT/AT)$) e a razão entre bactérias filamentosas e sólidos suspensos (CT/SST) foram também alvos de estudo deste trabalho, encontrando-se representados na **Figura 4**. Saliente-se que o parâmetro $\ln(CT/$

AT) foi utilizado com o intuito de se verificar se este pode ser entendido como um eficaz substituto do parâmetro CT/SST, uma vez que o factor de correlação R obtido entre os dois foi de 0.97, e o parâmetro $\ln(CT/AT)$ apresenta a vantagem de não depender da determinação dos SST. Analisando os resultados obtidos verificou-se que o conteúdo em bactérias fi-

anúncio LIPOR
FALTA

lamentosas (CT/Vol) e as razões $\ln(\text{CT}/\text{AT})$ e CT/SST apresentaram os maiores valores em *bulking* filamentoso, o que seria expectável devido ao maior crescimento das bactérias filamentosas durante estes períodos. Este facto vem reforçar a identificação do período de *bulking* referido como BF2 como sendo, de facto, de origem filamentosa. Durante o período de *bulking* viscoso, foi notório o crescimento do conteúdo em biomassa agregada (AT/Vol), em concordância com o crescimento evidenciado pelos SST referido anteriormente. Por outro lado, o conteúdo em bactérias filamentosas (CT/Vol) apresentou uma tendência decrescente, tal como as razões $\ln(\text{CT}/\text{AT})$ e CT/SST . Estes factos seriam expectáveis, uma vez que as condições associadas ao *bulking* viscoso potenciam o crescimento da biomassa agregada por oposição à filamentosa. Em relação ao período de formação de flocos *pin point* verificou-se uma diminuição do conteúdo em biomassa agregada (AT/Vol), concordante com a diminuição evidenciada pelos SST, o que configura um *washout* da biomassa. Apesar do conteúdo em biomassa filamentosa (CT/Vol) se manter baixo e aproximadamente constante durante este período, as razões $\ln(\text{CT}/\text{AT})$ e CT/SST sofreram um crescimento contínuo ao longo deste período. Tal facto é explicável pelo elevado *washout* da biomassa agregada referido anteriormente. Analisando a estrutura da biomassa no período de condições normais, esta revelou um conteúdo em bactérias filamentosas e as razões $\ln(\text{CT}/\text{AT})$ e CT/SST baixas.

3.3 Correlações para a aferição do IVL

Os parâmetros obtidos por análise de imagem permitiram ainda a aferição do IVL, e o esclarecimento das inter-relações entre este e a composição da biomassa. Deste modo,

foram estudadas as correlações entre o IVL e o conteúdo em bactérias filamentosas (CT/Vol), a razão do conteúdo em filamentosas com os sólidos suspensos (CT/SST), e a razão do conteúdo em filamentosas com a biomassa agregada ($\ln(\text{CT}/\text{AT})$), apresentadas na **Figura 5**.

Na **Figura 5a** pode-se observar uma dependência directa entre o IVL e o conteúdo em biomassa filamentosa (factor de correlação R de 0.91), para o total das experiências com CT/Vol acima de $7 \text{ mm } \mu\text{L}^{-1}$. Abaixo do valor de $7 \text{ mm } \mu\text{L}^{-1}$ a quantidade de bactérias filamentosas parece não influir directamente para o IVL. Verificou-se ainda que a correlação encontrada se encontra fortemente dependente das condições de *bulking* filamentoso e viscoso, uma vez que estas duas condições propiciam os valores de conteúdo em filamentosas e de IVL que se estendem pela maior gama de dependência directa. O mesmo tipo de análise foi efectuada para a correlação entre o IVL e a razão CT/SST , utilizado em estudos anteriores (Amaral *et al.*, 2003, Amaral e Ferreira, 2005, Lee *et al.*, 1983; Matsui e Yamamoto, 1984). Mais uma vez se verificou uma dependência directa (R de 0.89), para o total das experiências com CT/SST acima de 2000 mm mg^{-1} . Abaixo do valor de 2000 mm mg^{-1} , contudo, a razão CT/SST parece não influir directamente para o IVL. Verificou-se também que a correlação encontrada se encontra fortemente dependente das condições de *bulking* filamentoso e viscoso, uma vez que estas propiciam os valores de CT/SST e de IVL que se estendem pela maior gama de dependência directa. Apesar de, nos estudos referidos, se ter provado a adequabilidade da utilização do parâmetro CT/SST na aferição do IVL em *bulking* filamentoso, os resultados obtidos neste trabalho, para um maior



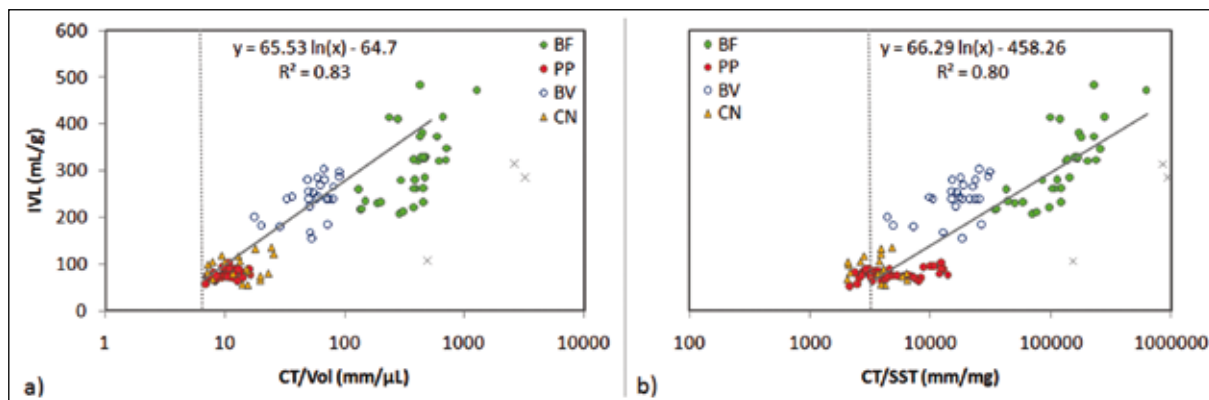


FIGURA 5 | Correlações entre IVL e (a) conteúdo em filamentosas, (b) CT/SST. A linha a tracejado representa o limite de aplicação da correlação e os pontos em cruz representam os pontos eliminados. (BF – *Bulking* filamentoso; PP – *Flocos pin point*; BV – *Bulking* viscoso; CN – condições normais)

conjunto de condições, parecem apontar para uma maior adequabilidade do parâmetro CT/Vol no geral. Em relação ao uso do parâmetro $\ln(\text{CT}/\text{AT})$ em substituição de CT/SST, este não

se verificou tão eficaz de aferir o valor de IVL, tendo apresentado um valor de factor de correlação R de apenas 0.85.

■ AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar o seu agradecimento à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pela bolsa de doutoramento SFRH/BD/32329/2006.

■ CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos verificou-se que as condições de *bulking* filamentoso provocaram um elevado conteúdo da biomassa agregada em microflocos, quer sob a forma de agregados dispersos no licor misto, quer ligados a bactérias filamentosas. Verificou-se ainda o mais elevado conteúdo em bactérias filamentosas, assim como os maiores valores das razões CT/AT e CT/SST. Relativamente à experiência de formação de flocos *pin point*, verificou-se a formação de microflocos não agregados à (biomassa filamentosa). Foi ainda possível de se verificar um fenómeno de *washout* da biomassa pela diminuição do conteúdo em biomassa agregada e dos SST que provocou um incremento das razões CT/AT e CT/SST. Os agregados formados durante esta experiência revelaram-se ainda praticamente não sedimentáveis e facilmente removíveis do reactor. As condições de *bulking* viscoso provocaram uma maior composição da biomassa em macroflocos, que as restantes condições, assim como o crescimento do conteúdo em biomassa agregada e dos SST. O conteúdo em bactérias filamentosas apresentou uma tendência decrescente, tal como as razões CT/AT e CT/SST. A estrutura da biomassa em condições normais, revelou um predomínio de mesoflocos e valores residuais de macroflocos, assim como um conteúdo em bactérias filamentosas baixo, tal como as razões CT/AT e CT/SST. No tocante à previsão do valor de IVL, no conjunto das condições estudadas, esta apenas se revelou exequível para conteúdos em biomassa filamentosa acima de 7 mm μL^{-1} .

■ REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, A.L. (2003). *Image Analysis in Biotechnological Processes: Applications to Wastewater Treatment*. Tese de Doutorado, Universidade do Minho, Braga (<http://hdl.handle.net/1822/4506>).
- Amaral A.L., Ferreira E.C. (2005) Activated sludge monitoring of a wastewater treatment plant using image analysis and partial least squares regression. *Analytica Chimica Acta* 544, 246-253.
- Andreadakis A. (1993). Physical and chemical properties of activated sludge flocs. *Water Research* 12, 1707-1714.
- APHA, AWWA, WPCF (1989). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17th Ed., American Public Health Association, Washington D.C.
- Arelli A., Luccarini L., Madoni P. (2009). Application of image analysis in activated sludge to evaluate correlations between settleability and features of flocs and filamentous species. *Water Science and Technology* 59 (10), 2029-2036.
- Barbusinski K., Koscielniak H. (1995). Influence of substrate loading intensity on floc size in activated sludge process. *Water Research* 29 (7), 1703-1710.
- Bitton G. (1994) *Wastewater Microbiology*, Wiley-Liss Pub., New York.
- Genes C, Van Beurden K.P., Jenné R., Van Impe J.F. (2002). On the development of a novel image analysis technique to distinguish between flocs and filaments in activated sludge images. *Water Science and Technology* 46 (1-2), 381-387.
- da Motta M., Pons M.N., Roche N., Vivier H. (2001). Characterization of activated sludge by automated image analysis. *Biochemical Engineering Journal* 9, 165-173.
- da Motta M., Pons M.N., Roche N. (2002). Study of filamentous bacteria by image analysis and relation with settleability. *Water Science and Technology* 46 (1-2), 363-369.
- Grijpspeerd K., Verstraete W. (1997). Image analysis to estimate the settleability and concentration of activated sludge. *Water Research* 31 (5), 1126-1134.
- Jenkins D., Richard M.G., Daigger G. (2003). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems*. Lewis publishing, Boca Raton, FL.
- Jenné R., Banadda E.N., Gins G., Deurinck J., Smets I.Y., Geeraerd A.H., Van Impe J.F. (2006). Use of image analysis for sludge characterisation: studying the relation between floc shape and sludge settleability. *Water Science and Technology* 54(1), 167-174.
- Kim I.S., Kim S.M., Jang A. (2008) Characterization of aerobic granules by microbial density at different COD loading rates. *Bioresource Technology* 99 (1), 18-25
- Lee S.E., Koopman B., Bode H., Jenkins D. (1983). Evaluation of alternative sludge settleability indexes. *Water Research* 17 (10), 1421-1426.
- Li D., Ganczarczyk J. (1991). Size distribution of activated sludge flocs. *Journal of Water Pollution Control Federation* 63, 806-814.
- Matsui S., Yamamoto R. (1984). The use of color TV technique for measuring filament length and investigating sludge bulking causes. *Water Science and Technology* 16 (10-1), 69-81.
- Wilén B.M., Balmer P. (1999). The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research* 33 (2), 391-400.